

# TENT COOPERATION TREATY

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 17 April 2000 (17.04.00)	
<b>International application No.</b> PCT/EP99/05890	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 23138 WO
<b>International filing date (day/month/year)</b> 11 August 1999 (11.08.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 12 August 1998 (12.08.98)
<b>Applicant</b> RAUSCH, Thomas	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
10 March 2000 (10.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b>  <p style="text-align: center;">Claudio Borton</p> Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
FÜR DAS GEBIET DES PATENTWESENS

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>23138 WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 05890</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>11/08/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/08/1998</b>
Anmelder  <b>RAUSCH, Thomas</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

### 1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

### 4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

### 5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 17 NOV 2000

WIPO PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 23138 WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05890	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/08/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 12/08/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder RAUSCH, Thomas		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  10/03/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  15.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Meyer, W  Tel. Nr. +49 89 2399 8157 

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05890

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-25                      ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-21                      eingegangen am                      06/09/2000    mit Schreiben vom    04/09/2000

### Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5                      ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05890

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.  
☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.  
☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.  
☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist  
☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.  
☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05890

---

## 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-13
	Nein: Ansprüche	14-21
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-13
	Nein: Ansprüche	14-21
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	

## 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

Zu Punkt I

1. Die mit dem Schreiben vom 4.09.2000 eingereichten Änderungen erfüllen den Artikel 34 (2) b) PCT.

Zu Punkt III

2. Die internationale Recherchenbehörde hat einen Internationalen Recherchenbericht für die gesamte Anmeldung erstellt. Die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde, ist jedoch der Ansicht, daß die Anmeldung nicht den Erfordernisse der Einheitlichkeit im Sinne von Artikel 34(3) und Regel 13 PCT entspricht.

3. Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 116, Februar 1998, Seiten 733-742

4. Eine Internationale Anmeldung sollte nur eine einzige Erfindung enthalten oder eine Gruppe von Erfindungen, die untereinander in solch einer Weise verbunden sind, daß sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen. Einheitlichkeit der Erfindung ist nur dann gegeben, wenn es sich um eine technische Wechselbeziehung handelt, die in den Patentansprüchen durch gleiche oder entsprechende besondere technische Merkmale zum Ausdruck gebracht werden. Unter dem Begriff "besondere technische Merkmale" sind in jedem einzelnen Patentanspruch diejenigen technischen Merkmale zu verstehen, die einen Beitrag der beanspruchten Erfindung **als Ganzes** zum Stand der Technik kennzeichnen.

5. Die technische Wechselbeziehung zwischen den Ansprüchen betrifft das Offenbaren von Genen welche für Invertase Inhibitoren kodieren. Diese Gene sind jedoch schon bekannt. D1 offenbart das Klonieren eines Invertase Inhibitors (D1, Zusammenfassung u. S. 741, linke Spalte, letzter Abschnitt).  
Es liegt daher kein gemeinsames "besonderes technisches Merkmal" vor, das

einen Beitrag zu jeder einzelnen beanspruchten Erfindung zum Stand der Technik liefert (Regel 13.1-3 PCT).

6. Folgende "potentielle" Erfindungen müssen getrennt betrachtet werden:
1. **Ansprüche 1-13 und 15-17** beziehen sich auf ein Verfahren zum Herstellen von transgenen Pflanzen, deren Samen eine erhöhte Speicherstoffmenge aufweist und auf transgene Pflanzen die durch dieses Verfahren hergestellt wurden.
  2. **Ansprüche 14 und 18-21** beziehen sich auf ein Verfahren zur Gewinnung eines Vektors der eine Invertaseinhibitor-cDNS-Sequenz enthält und auf die Verwendung dieser cDNS.

**Zu Punkt V**

7. Die gegenwärtige Anmeldung handelt von einem Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen die eine verminderte Expression von Invertaseinhibitoren haben und auf transgene Pflanzen, welche durch solch ein Verfahren hergestellt wurden.
- Weiterhin wird in dieser Anmeldung ein Verfahren zur Gewinnung von der Vektoren gezeigt, welche zur Herstellung der oben erwähnten transgenen Pflanzen benutzt werden können.
8. Der Gegenstand der **Ansprüche 14 und 18-21** ist im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu.
- D1 offenbart ein Verfahren zur Gewinnung eines Vektors der eine Invertaseinhibitor cDNS enthält (D1, S. 734 rechte Spalte). Diese Verfahren ist identisch mit dem in **Anspruch 14** beanspruchten Verfahren.
- Weiterhin wird in D1 (D1, S. 741, letzter Abschnitt) auch die Verwendung diese Gens zur Herstellung transgener Pflanzen offenbart (gemäß gegenwärtiger **Ansprüchen 18-21**).
- Folglich, können die **Ansprüche 14 und 18-21** nicht als neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT angesehen werden.



9. Ein Verfahrenserzeugnis (siehe gegenwärtige **Ansprüche 15-17**) ist nicht dadurch neu, daß es durch ein anderes Verfahren erzeugt wurde. Ansprüche für ein Erzeugnis, welche durch ein Verfahren definiert sind, sind nur erlaubt, wenn das Erzeugnis als solches neu oder erfinderisch ist. Transgene Pflanzen, die ein Inhibitor Gen in anti-sense expremieren sind aus D1 bekannt (D1, S. 741, linke Spalte, letzter Abschnitt). Folglich, erfüllen **Ansprüche 15-17** nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT. Es ist hierbei auch angemerkt, daß sich **Ansprüche 16 und 17** auf Vermehrung- und Erntematerial einer transgenen Pflanzen beziehen. Ohne einen direkten bezug auf den transgenen Charakter dieses Materials können diese Ansprüche auch unter diesem Aspekt als nicht neu angesehen werden.
10. Das Dokument D1, wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen. Dies Dokument offenbart ein Verfahren zum Aufreinigen und Klonieren eines Inhibitors der Tabak-Zellwandinvertase, von dem sich der Gegenstand des **Anspruchs 1** dadurch unterscheidet, daß ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze offenbart wird. Die transgene Pflanze weist eine erhöhte Speicherstoffmenge auf.  
Der Gegenstand des **Anspruchs 1** ist somit neu (Artikel 33 (2) PCT).  
Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein Invertase Gen aus einer cDNS-Libaray von Blüten zur Herstellung transgener Pflanzen zu benützen.  
Die in **Anspruch 1** der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung beruht aus den folgenden Gründen auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT):  
Zwar offenbart D1 das Klonieren eines Invertase Gens und es wird auch schon auf das Vorhandensein von Transgenen hingewiesen. Aber keines der im Rechernbericht zitierten Dokumente offenbart ein Verfahren, welches zu erhöhter Speicherstoffmenge in Samen führt.
11. Die **Ansprüche 2-13** sind vom **Anspruch 1** abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit.

PCT/EP99/05890  
Anm.: SDZ ...

23 138 SC-tn-re  
4. September 2000

**Neue Ansprüche 1 bis 21**

1. Verfahren zur Herstellung einer transgenen, eine deregulierte und die Samenentwicklung fördernde Invertaseaktivität aufweisenden Pflanze, wobei eine Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors aus einer cDNA-Bank von Blüten mit jungen Samenanlagen einer Pflanze gewonnen wird, eine Pflanzenzelle einer Pflanze der gleichen Art oder Sorte, aus der die Nucleotidsequenz stammt oder abgeleitet ist, mit einem DNA-Konstrukt, enthaltend die mit mindestens einer regulatorischen Einheit funktionell verbundene Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors, transformiert, kultiviert und eine Pflanze regeneriert wird, deren Samen eine gegenüber nicht transformierten Wildtyppflanzen erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die regulatorische Einheit ein Promotor ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Promotor ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Promotor der 35SCaMV Promotor oder der Ubiquitin- oder Zein-Promotor aus Mais ist.

-2-

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors eine cDNA, eine damit hybridisierende Nucleotidsequenz oder ein Fragment einer der beiden ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Invertaseinhibitor ein apoplastischer Invertaseinhibitor ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors sense- oder antisense-Orientierung zu dem Promotor aufweist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das DNA-Konstrukt weitere regulatorische Einheiten, insbesondere ein Transcriptionsterminationssignal, aufweist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Transcriptionsterminationssignal aus dem NOS-Gen von *Agrobacterium tumefaciens* stammt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle einer dicotylen oder monocotylen Pflanze ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle von Raps, Sonnenblumen, Erdnuß, Sojabohne, Ölpalme, Reis, Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Erbse, *Calendula officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Crambe abyssinica*,

*Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnanthes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis* oder *Simmondsia chinensis* ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das DNA-Konstrukt in einem Vektor, insbesondere einem Plasmid oder Virus, vorliegt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Transformation der Pflanzenzelle mittels *Agrobacterium tumefaciens*, biolistischer Verfahren, mittels elektrisch oder chemisch induzierter DNA-Aufnahme, Elektroporation, Makroinjektion, Mikroinjektion oder PEG-vermittelter Transformation durchgeführt wird.
14. Verfahren zur Gewinnung von in einem Vektor enthaltenden Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in sense- oder antisense-Orientierung, umfassend folgende Schritte:
  - a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion von Blüten mit jungen Samenanlagen,
  - b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entsprechenden Peptide,
  - c) Clonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank, insbeson-

- 4 -

dere von Blüten mit jungen Samenanlagen  
und

d) Clonierung der Invertaseinhibitor-cDNA in  
sense- oder antisense-Orientierung in ei-  
nem Vektor, insbesondere einen binären  
Vektor.

15. Transgene Pflanze, herstellbar nach einem der  
Verfahren der Ansprüche 1 bis 13 sowie ein Teil  
davon.
16. Vermehrungs- und Erntematerial einer transgenen  
Pflanze nach Anspruch 15.
17. Vermehrungs- und Erntematerial einer transgenen  
Pflanze nach Anspruch 16, das Frucht, Samen,  
Samenschale, Embryo, Sämling, Kallus, Zellkul-  
tur, Stengel, Blatt oder Wurzel ist.
18. Verwendung einer funktionell mit mindestens ei-  
ner regulatorischen Einheit verbundenen Nucleo-  
tidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zur  
Transformation und Herstellung von transgenen  
Pflanzen, die als Folge der Transformation eine  
modifizierte Samenentwicklung aufweisen.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die modifi-  
zierte Samenentwicklung eine Samenentwicklung  
ist, gemäß der die Samen der transgenen Pflanze  
eine gegenüber Samen einer nicht transformier-  
ten Wildtyppflanze eine erhöhte Speicherstoff-  
menge aufweisen.

- 5 -

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 oder 19 wobei die Nucleotidsequenz aus einer cDNA-Bank von Blüten mit jungen Samenanlagen der zu transformierenden Pflanzenart oder -sorte stammt oder davon abgeleitet ist.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Nucleotidsequenz in antisense-Orientierung zu der mindestens einen regulatorischen Einheit, insbesondere dem Promotor, vorliegt.

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N5/10 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GREINER, S., ET AL. : "cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 116, Februar 1998 (1998-02), Seiten 733-742, XP002125613 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-5, 11-22, 24-32
A	KRAUSGRILL, S., ET AL. : "in transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase" THE PLANT JOURNAL, Bd. 13, Nr. 2, Januar 1998 (1998-01), Seiten 275-280, XP002125614 das ganze Dokument	1-32



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Dezember 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KRAUSGRILL S ET AL: "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, Bd. 47, Seite 1193-1198 XP002050469 ISSN: 0022-0957 Seite 1194, linke Spalte; Seite 1197 ---	1-32
A	SANDER A ET AL: "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 385, Nr. 3, Seite 171-175 XP002049864 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument ---	1-32
A	EP 0 442 592 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21. August 1991 (1991-08-21) Spalte 15 -Spalte 18 ---	1-32
A	WO 97 07221 A (RIESMEIER JOERG ;TRETHERWEY RICHARD (DE); WILLMITZER LOTHAR (DE)) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Seite 5 ---	1-32
A	WO 98 04722 A (RAUSCH THOMAS ;GREINER STEFFEN (DE); UNIV HEIDELBERG (DE); KRAUSGR) 5. Februar 1998 (1998-02-05) Seite 12, Zeile 3-9 -----	1-32



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

T/EP 99/05890

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0442592	A	21-08-1991	DE 4004800 A	14-08-1991
			AU 650639 B	30-06-1994
			AU 7089891 A	15-08-1991
			CA 2036103 A	14-08-1991
			JP 5049482 A	02-03-1993
			US 5436394 A	25-07-1995
			US 5917127 A	29-06-1999
<hr/>				
WO 9707221	A	27-02-1997	DE 19529696 A	13-02-1997
			AU 6820496 A	12-03-1997
			CA 2229061 A	27-02-1997
			CN 1196090 A	14-10-1998
			EP 0846180 A	10-06-1998
<hr/>				
WO 9804722	A	05-02-1998	DE 19630738 A	05-02-1998
			EP 0956357 A	17-11-1999
<hr/>				

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>23138 WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/05890</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>11/08/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/08/1998</b>
Anmelder  <b>RAUSCH, Thomas</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

### 1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

### 4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

### 5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

### 6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. -

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05890

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N5/10 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GREINER, S., ET AL. : "cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 116, Februar 1998 (1998-02), Seiten 733-742, XP002125613 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-5, 11-22, 24-32
A	KRAUSGRILL, S., ET AL. : "in transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase" THE PLANT JOURNAL, Bd. 13, Nr. 2, Januar 1998 (1998-01), Seiten 275-280, XP002125614 das ganze Dokument --- -/--	1-32



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>a</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Dezember 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KRAUSGRILL S ET AL: "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, Bd. 47, Seite 1193-1198 XP002050469 ISSN: 0022-0957 Seite 1194, linke Spalte; Seite 1197 ---	1-32
A	SANDER A ET AL: "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 385, Nr. 3, Seite 171-175 XP002049864 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument ---	1-32
A	EP 0 442 592 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21. August 1991 (1991-08-21) Spalte 15 -Spalte 18 ---	1-32
A	WO 97 07221 A (RIESMEIER JOERG ; TRETHEWEY RICHARD (DE); WILLMITZER LOTHAR (DE)) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Seite 5 ---	1-32
A	WO 98 04722 A (RAUSCH THOMAS ; GREINER STEFFEN (DE); UNIV HEIDELBERG (DE); KRAUSGR) 5. Februar 1998 (1998-02-05) Seite 12, Zeile 3-9 -----	1-32

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05890

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0442592 A	21-08-1991	DE 4004800 A	14-08-1991
		AU 650639 B	30-06-1994
		AU 7089891 A	15-08-1991
		CA 2036103 A	14-08-1991
		JP 5049482 A	02-03-1993
		US 5436394 A	25-07-1995
		US 5917127 A	29-06-1999
W0 9707221 A	27-02-1997	DE 19529696 A	13-02-1997
		AU 6820496 A	12-03-1997
		CA 2229061 A	27-02-1997
		CN 1196090 A	14-10-1998
		EP 0846180 A	10-06-1998
W0 9804722 A	05-02-1998	DE 19630738 A	05-02-1998
		EP 0956357 A	17-11-1999

09/762782  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

6

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 23138 WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/05890	International filing date (day/month/year) 11 August 1999 (11.08.99)	Priority date (day/month/year) 12 August 1998 (12.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82,		
Applicant RAUSCH, Thomas		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 10 March 2000 (10.03.00)	Date of completion of this report 15 November 2000 (15.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05890

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages 1-25, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages 1-21, filed with the letter of 04 September 2000 (04.09.2000)
- ☒ the drawings:  
 pages 1/5-5/5, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05890

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

1. The amendments submitted with the letter of 4  
September 2000 comply with PCT Article 34(2)(b).



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/05890

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX IV.3

2. The International Search Authority has established an international search report for the entire application. However, the International Preliminary Examining Authority is of the opinion that the application does not meet the requirement for unity of invention of PCT Article 34(3) and PCT Rule 13.

3. This report makes reference to the following document:

D1: PLANT PHYSIOLOGY, Vol. 116, February 1998,  
pages 733-742.

4. An international application should contain a single invention or a group of inventions interconnected in such a way that they form a single general inventive concept. Unity of invention is established only when there is a technical relationship embodied in the claims by the same or corresponding special technical features. The expression "special technical features" should be understood to mean those technical features in each claim which characterise the contribution of the claimed invention as a whole to the prior art.

5. The technical relationship between the claims concerns the disclosure of genes that code for invertase inhibitors. However, these genes are already known. D1 discloses the cloning of an invertase inhibitor (D1, the abstract and page 741,

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05890

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX IV.3

left-hand column, last paragraph).

Consequently, the claims do not contain a common "special technical feature" which defines the contribution of each claimed invention to the prior art (PCT Rule 13.1-3).

6. The following "potential" inventions must be considered separately:
  1. **Claims 1-13 and 15-17** concern a method for producing transgenic plants whose seeds contain an increased quantity of storage substances, and the transgenic plants produced by this method.
  2. **Claims 14 and 18-21** concern a method for extracting a vector containing an invertase inhibitor cDNA sequence, and the use of said cDNA.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/05890

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims	14-21	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-13	YES
	Claims	14-21	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

7. The present application concerns a method for producing transgenic plants with reduced expression of invertase inhibitors, and the transgenic plants produced by this method.

Moreover, this application discloses a method for extracting vectors that can be used for producing the above-mentioned transgenic plants.

8. The subject matter of **Claims 14 and 18-21** is not novel (PCT Article 33(2)).

D1 discloses a method for extracting a vector containing an invertase inhibitor cDNA (D1, page 734, right-hand column). That method is identical to the method **as per Claim 14**.

D1 also discloses (D1, page 741, last paragraph) the use of this gene for producing transgenic plants (as per the present **Claims 18-21**).

Consequently, **Claims 14 and 18-21** cannot be considered novel (PCT Article 33(2)).

9. The product of a method (see the present **Claims 15-17**) is not rendered novel when produced by another method. Claims to a product defined by a method are allowed only when the product as such is novel or inventive. Transgenic plants which express an anti-sense inhibitor gene are known from D1 (D1, page 741, left-hand column, last paragraph). Consequently, **Claims 15-17** do not meet the requirement of PCT Article 33(2). It should also be noted in this respect that **Claims 16 and 17** concern reproductive and harvested material from a transgenic plant. Without a direct reference to the transgenic character of said material, these claims would not be considered novel in this respect either.
10. D1 is considered the closest prior art and discloses a method for purifying and cloning an inhibitor of tobacco cell wall invertase from which the subject matter of **Claim 1** differs in that it discloses a method for producing a transgenic plant. The transgenic plant contains an increased quantity of storage substances.

The subject matter of **Claim 1** is therefore novel (PCT Article 33(2)).

The present invention can therefore be considered to address the problem of using an invertase gene from a flower cDNA library for producing transgenic plants.

The solution to this problem, as proposed in **Claim 1** of the present application, involves an inventive step (PCT Article 33(3)) for the following reasons:

Although D1 discloses the cloning of an invertase gene and also notes the existence of transgenic plants, none of the search report citations discloses a method that leads to an increased quantity of storage substances in seeds.

11. **Claims 2-13** are dependent on **Claim 1** and therefore also meet the PCT requirements for novelty and inventive step.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>23138 WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP99/05890</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>11/08/1999</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>12/08/1998</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>C12N15/82</b>		
Anmelder <b>RAUSCH, Thomas</b>		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags <b>10/03/2000</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <b>15.11.2000</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  <b>Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465</b>	Bevollmächtigter Bediensteter <b>Meyer, W</b> Tel. Nr. +49 89 2399 8157 

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05890

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-21 eingegangen am

06/09/2000 mit Schreiben vom 04/09/2000

WITH ENGLISH TRANSLATION  
ATTACHED

### Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05890

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.  
☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.  
☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.  
☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- ☐ erfüllt ist  
☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- ☒ alle Teile.  
☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05890

---

## 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-13
	Nein: Ansprüche	14-21
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-13
	Nein: Ansprüche	14-21
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-21
	Nein: Ansprüche	

## 2. Unterlagen und Erklärungen **siehe Beiblatt**

**Zu Punkt I**

1. Die mit dem Schreiben vom 4.09.2000 eingereichten Änderungen erfüllen den Artikel 34 (2) b) PCT.

**Zu Punkt III**

2. Die internationale Recherchenbehörde hat einen Internationalen Recherchenbericht für die gesamte Anmeldung erstellt. Die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde, ist jedoch der Ansicht, daß die Anmeldung nicht den Erfordernisse der Einheitlichkeit im Sinne von Artikel 34(3) und Regel 13 PCT entspricht.

3. Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 116, Februar 1998, Seiten 733-742

4. Eine Internationale Anmeldung sollte nur eine einzige Erfindung enthalten oder eine Gruppe von Erfindungen, die untereinander in solch einer Weise verbunden sind, daß sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen. Einheitlichkeit der Erfindung ist nur dann gegeben, wenn es sich um eine technische Wechselbeziehung handelt, die in den Patentansprüchen durch gleiche oder entsprechende besondere technische Merkmale zum Ausdruck gebracht werden. Unter dem Begriff "besondere technische Merkmale" sind in jedem einzelnen Patentanspruch diejenigen technischen Merkmale zu verstehen, die einen Beitrag der beanspruchten Erfindung **als Ganzes** zum Stand der Technik kennzeichnen.
5. Die technische Wechselbeziehung zwischen den Ansprüchen betrifft das Offenbaren von Genen welche für Invertase Inhibitoren kodieren. Diese Gene sind jedoch schon bekannt. D1 offenbart das Klonieren eines Invertase Inhibitors (D1, Zusammenfassung u. S. 741, linke Spalte, letzter Abschnitt).  
Es liegt daher kein gemeinsames "besonderes technisches Merkmal" vor, das

einen Beitrag zu jeder einzelnen beanspruchten Erfindung zum Stand der Technik liefert (Regel 13.1-3 PCT).

6. Folgende "potentielle" Erfindungen müssen getrennt betrachtet werden:
1. **Ansprüche 1-13 und 15-17** beziehen sich auf ein Verfahren zum Herstellen von transgenen Pflanzen, deren Samen eine erhöhte Speicherstoffmenge aufweist und auf transgene Pflanzen die durch dieses Verfahren hergestellt wurden.
  2. **Ansprüche 14 und 18-21** beziehen sich auf ein Verfahren zur Gewinnung eines Vektors der eine Invertaseinhibitor-cDNS-Sequenz enthält und auf die Verwendung dieser cDNS.

#### Zu Punkt V

7. Die gegenwärtige Anmeldung handelt von einem Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen die eine verminderte Expression von Invertaseinhibitoren haben und auf transgene Pflanzen, welche durch solch ein Verfahren hergestellt wurden.
- Weiterhin wird in dieser Anmeldung ein Verfahren zur Gewinnung von der Vektorern gezeigt, welche zur Herstellung der oben erwähnten transgenen Pflanzen benutzt werden können.
8. Der Gegenstand der **Ansprüche 14 und 18-21** ist im Sinne von Artikel 33(2) PCT nicht neu.
- D1 offenbart ein Verfahren zur Gewinnung eines Vektors der eine Invertaseinhibitor cDNS enthält (D1, S. 734 rechte Spalte). Diese Verfahren ist identisch mit dem in **Anspruch 14** beanspruchten Verfahren.
- Weiterhin wird in D1 (D1, S. 741, letzter Abschnitt) auch die Verwendung diese Gens zur Herstellung transgener Pflanzen offenbart (gemäß gegenwärtiger **Ansprüchen 18-21**).
- Folglich, können die **Ansprüche 14 und 18-21** nicht als neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT angesehen werden.

9. Ein Verfahrenserzeugnis (siehe gegenwärtige **Ansprüche 15-17**) ist nicht dadurch neu, daß es durch ein anderes Verfahren erzeugt wurde. Ansprüche für ein Erzeugnis, welche durch ein Verfahren definiert sind, sind nur erlaubt, wenn das Erzeugnis als solches neu oder erfinderisch ist. Transgene Pflanzen, die ein Inhibitor Gen in anti-sense exprimieren sind aus D1 bekannt (D1, S. 741, linke Spalte, letzter Abschnitt). Folglich, erfüllen **Ansprüche 15-17** nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT. Es ist hierbei auch angemerkt, daß sich **Ansprüche 16 und 17** auf Vermehrung- und Erntematerial einer transgenen Pflanzen beziehen. Ohne einen direkten bezug auf den transgenen Charakter dieses Materials können diese Ansprüche auch unter diesem Aspekt als nicht neu angesehen werden.
10. Das Dokument D1, wird als nächstliegender Stand der Technik angesehen. Dies Dokument offenbart ein Verfahren zum Aufreinigen und Klonieren eines Inhibitors der Tabak-Zellwandinvertase, von dem sich der Gegenstand des **Anspruchs 1** dadurch unterscheidet, daß ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze offenbart wird. Die transgene Pflanze weist eine erhöhte Speicherstoffmenge auf.  
Der Gegenstand des **Anspruchs 1** ist somit neu (Artikel 33 (2) PCT).  
Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, ein Invertase Gen aus einer cDNS-Library von Blüten zur Herstellung transgener Pflanzen zu benutzen.  
Die in **Anspruch 1** der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung beruht aus den folgenden Gründen auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT):  
Zwar offenbart D1 das Klonieren eines Invertase Gens und es wird auch schon auf das Vorhandensein von Transgenen hingewiesen. Aber keines der im Rechnerbericht zitierten Dokumente offenbart ein Verfahren, welches zu erhöhter Speicherstoffmenge in Samen führt.
11. Die **Ansprüche 2-13** sind vom **Anspruch 1** abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit.

PCT/EP99/05890  
Anm.: SDZ ...

23 138 SC-tn-re  
4. September 2000

Neue Ansprüche 1 bis 21

1. Verfahren zur Herstellung einer transgenen, eine deregulierte und die Samenentwicklung fördernde Invertaseaktivität aufweisenden Pflanze, wobei eine Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens aus einer cDNA-Bank von Blüten mit jungen Samenanlagen einer Pflanze gewonnen wird, eine Pflanzenzelle einer Pflanze der gleichen Art oder Sorte, aus der die Nucleotidsequenz stammt oder abgeleitet ist, mit einem DNA-Konstrukt, enthaltend die mit mindestens einer regulatorischen Einheit funktionell verbundene Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens, transformiert, kultiviert und eine Pflanze regeneriert wird, deren Samen eine gegenüber nicht transformierten Wildtyppflanzen erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die regulatorische Einheit ein Promotor ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Promotor ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Promotor der 35SCaMV Promotor oder der Ubiquitin- oder Zein-Promotor aus Mais ist.

-2-

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors eine cDNA, eine damit hybridisierende Nucleotidsequenz oder ein Fragment einer der beiden ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Invertaseinhibitor ein apoplastischer Invertaseinhibitor ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors sense- oder antisense-Orientierung zu dem Promotor aufweist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das DNA-Konstrukt weitere regulatorische Einheiten, insbesondere ein Transcriptionsterminationssignal, aufweist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Transcriptionsterminationssignal aus dem NOS-Gen von *Agrobacterium tumefaciens* stammt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle einer dicotylen oder monocotylen Pflanze ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle von Raps, Sonnenblumen, Erdnuß, Sojabohne, Ölpalme, Reis, Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Erbse, *Calendula officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Crambe abyssinica*,

*Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnanthes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis* oder *Simmondsia chinensis* ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das DNA-Konstrukt in einem Vektor, insbesondere einem Plasmid oder Virus, vorliegt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Transformation der Pflanzenzelle mittels *Agrobacterium tumefaciens*, biolistischer Verfahren, mittels elektrisch oder chemisch induzierter DNA-Aufnahme, Elektroporation, Makroinjektion, Mikroinjektion oder PEG-vermittelter Transformation durchgeführt wird.
14. Verfahren zur Gewinnung von in einem Vektor enthaltenden Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in sense- oder antisense-Orientierung, umfassend folgende Schritte:
  - a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion von Blüten mit jungen Samenanlagen,
  - b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entsprechenden Peptide,
  - c) Clonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank, insbeson-

- 4 -

dere von Blüten mit jungen Samenanlagen  
und

d) Clonierung der Invertaseinhibitor-cDNA in  
sense- oder antisense-Orientierung in ei-  
nem Vektor, insbesondere einen binären  
Vektor.

15. Transgene Pflanze, herstellbar nach einem der  
Verfahren der Ansprüche 1 bis 13 sowie ein Teil  
davon.
16. Vermehrungs- und Erntematerial einer transgenen  
Pflanze nach Anspruch 15.
17. Vermehrungs- und Erntematerial einer transgenen  
Pflanze nach Anspruch 16, das Frucht, Samen,  
Samenschale, Embryo, Sämling, Kallus, Zellkul-  
tur, Stengel, Blatt oder Wurzel ist.
18. Verwendung einer funktionell mit mindestens ei-  
ner regulatorischen Einheit verbundenen Nucleo-  
tidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zur  
Transformation und Herstellung von transgenen  
Pflanzen, die als Folge der Transformation eine  
modifizierte Samenentwicklung aufweisen.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die modifi-  
zierte Samenentwicklung eine Samenentwicklung  
ist, gemäß der die Samen der transgenen Pflanze  
eine gegenüber Samen einer nicht transformier-  
ten Wildtyppflanze eine erhöhte Speicherstoff-  
menge aufweisen.



20. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 oder 19 wobei die Nucleotidsequenz aus einer cDNA-Bank von Blüten mit jungen Samenanlagen der zu transformierenden Pflanzenart oder -sorte stammt oder davon abgeleitet ist.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Nucleotidsequenz in antisense-Orientierung zu der mindestens einen regulatorischen Einheit, insbesondere dem Promotor, vorliegt.

M.H

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/82, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/09719</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 24. Februar 2000 (24.02.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/05890  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 11. August 1999 (11.08.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 36 405.9      12. August 1998 (12.08.98)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> RAUSCH, Thomas [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 360, D-69120 Heidelberg (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> SCHRELL, Andreas usw.; Gleiss & Große, Maybachstrasse 6A, D-70469 Stuttgart (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BR, CA, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, MD, MX, PL, RO, RU, SK, TR, UA, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.          Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title: <u>TRANSGENIC PLANTS AND PLANT CELLS COMPRISING A REDUCED EXPRESSION OF INVERTASE INHIBITORS</u></b>		
<b>(54) Bezeichnung: TRANSGENE PFLANZEN UND PFLANZENZELLEN MIT VERMINDERTER EXPRESSION VON INVERTASEINHIBITOREN</b>		
<b>(57) Abstract</b>  The invention relates to transgenic plants and plant cells comprising a reduced expression of invertase inhibitors. The modification of the expression of the invertase inhibitors is achieved by introducing a cDNA sequence in an antisense orientation with respect to a promoter. The expression of the antisense DNA sequence results either by regulating the CaMV35S promoter or tissue-specific promoters.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit reduzierter Expression von Invertaseinhibitoren beschrieben. Die Veränderung der Expression der Invertaseinhibitoren wird durch Einführung einer cDNA-Sequenz in antisense-Orientierung zu einem Promotor erreicht. Die Expression der antisense-DNA-Sequenz erfolgt entweder unter der Regulation des CaMV35S-Promotors oder gewebespezifischer Promotoren.		

M.H

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/82, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/09719</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 24. Februar 2000 (24.02.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/05890 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 11. August 1999 (11.08.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 36 405.9      12. August 1998 (12.08.98)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> RAUSCH, Thomas [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 360, D-69120 Heidelberg (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> SCHRELL, Andreas usw.; Gleiss & Große, Maybachstrasse 6A, D-70469 Stuttgart (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BR, CA, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, MD, MX, PL, RO, RU, SK, TR, UA, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.          Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> TRANSGENIC PLANTS AND PLANT CELLS COMPRISING A REDUCED EXPRESSION OF INVERTASE INHIBITORS  <b>(54) Bezeichnung:</b> TRANSGENE PFLANZEN UND PFLANZENZELLEN MIT VERMINDERTER EXPRESSION VON INVERTASEINHIBITOREN  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to transgenic plants and plant cells comprising a reduced expression of invertase inhibitors. The modification of the expression of the invertase inhibitors is achieved by introducing a cDNA sequence in an antisense orientation with respect to a promoter. The expression of the antisense DNA sequence results either by regulating the CaMV35S promoter or tissue-specific promoters.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit reduzierter Expression von Invertaseinhibitoren beschrieben. Die Veränderung der Expression der Invertaseinhibitoren wird durch Einführung einer cDNA-Sequenz in antisense-Orientierung zu einem Promotor erreicht. Die Expression der antisense-DNA-Sequenz erfolgt entweder unter der Regulation des CaMV35S-Promotors oder gewebespezifischer Promotoren.		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Transgene Pflanzen und Pflanzenzellen mit verminderter Expression von Invertaseinhibitoren

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzenzellen und Pflanzen, Verfahren für deren Bereitstellung sowie die Verwendung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in antisense- oder sense-Orientierung zur Herstellung solcher Pflanzen.

Die Verbesserung von Qualität und/oder Quantität pflanzlicher Reservestoffe in Samen dicotyler und monocotyler landwirtschaftlicher Nutzpflanzen stellt ein wichtiges Ziel biotechnologischer Forschung dar. In der Regel wurden bisher Strategien entwickelt, die auf der Einführung bestimmter Gene basieren, deren Genprodukte Enzyme darstellen, die an der Synthese des Reservestoffes selbst (z.B. ADP-Glucosepyrophosphorylase) beteiligt sind. Desweiteren wurden aber auch Verfahren beschreiben, in denen durch veränderte Expression von heterologen und damit deregulierten Invertasen bzw. Glucokinasen im Cytosol eine erhöhte Glycolyserate erreicht wird (DE-A1-195 29 696). In letzterer Variante führt die erhöhte Spaltung von Saccharose durch eine deregulierte pilzliche Invertase in Kombination mit einer deregulierten bakteriellen Glucokinase zu einer verstärkten Glycolyserate. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, daß auf Grund der erhöhten

Konzentrationen an Intermediaten der Glycolyse die Synthese von Speicherölen in Samen stimuliert wird, da die Metabolisierung des primären Photoassimilats Saccharose zu phosphorylierten Hexosen bzw. den Fettsäurevorstufen Pyruvat und Acetyl-CoA gefördert wird.

Die DE-A1-195 29 696 beschreibt demgemäß die Einführung eines artfremden, z.B. pilzlichen Gens zur Expression der Invertase. Dieses pilzliche Invertase-Enzym, das artfremd ist und deshalb keiner Regulation unterliegt, wird aufgrund der Zuführung des fremden Gens unter der Regulation eines geeigneten Promotors verstärkt gebildet, wodurch der von der Invertase katalysierte Abbau der Saccharose in Glucose und Fructose beschleunigt erfolgt. Die mit höherer Geschwindigkeit erfolgende Bildung der Glucose soll letztendlich eine beschleunigte Produktion von pflanzlichen Speicherstoffen bewirken. Dieses Verfahren beruht auf einem Eingriff in den Metabolismus in der Zelle des Samenspeichergewebes, wobei der Assimilattransfer zwischen maternalen und Samenparenchym nur indirekt beeinflusst wird.

Die Bedeutung von Zellwand-Invertasen für die Entwicklung stärke- und proteinreicher Samen ist bekannt. So wird z.B. die Stärkeakkumulation in Maisamen bei verminderter Expression einer Zellwand-Invertase durch Störung des Assimilattransfers zwischen Pedicel und Endosperm gestört. Für verschiedene Pflanzenspezies sind blütenspezifische Zellwand-Invertase-Isoformen bekannt. Für *Nicotiana tabacum* konnte gezeigt werden, daß ein apoplastischer Invertaseinhibitor besonders im Ovar und den Staub-

blättern stark exprimiert wird. Greiner et al. (Plant Physiol. (1998), 733-742) offenbart die Aminosäure- und cDNA-Sequenz des genannten Invertaseinhibitors sowie dessen in vitro-Funktionsnachweis mittels heterolog exprimiertem Inhibitorprotein. Hingegen wurde eine in vivo-Hemmung noch nicht gezeigt. Bekannt ist es überdies, daß in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Zeitpunkten der pflanzlichen Entwicklung unterschiedliche Isoformen von Zellwandinvertasen und Invertaseinhibitoren vorliegen.

Eine gezielte Zuordnung der Aktivitäten und deren möglichen Zusammenwirken dieser zeit- und gewebe-spezifisch auftretenden beiden Proteine ist bisher nicht möglich. Untersuchungen zur in-vivo-Situation hinsichtlich der Regulation von Zellwand-Invertasen durch Invertaseinhibitoren sind nicht bekannt. Ebenso wenig war bekannt, ob und wenn ja welche Isoformen der Zellwandinvertasen während der Samenentwicklung einer endogenen Regulation durch Invertaseinhibitoren unterliegen und wenn ja, welche Isoformen der Invertaseinhibitoren. Die gezielte Nutzung dieser Proteine für die Herstellung vorteilhafter Pflanzen ist daher bisher nicht möglich.

Der Erfindung liegt daher das technische Problem zugrunde, transgene Pflanzenzellen, Pflanzen und diese herstellende Verfahren bereitzustellen, wobei die Pflanzen sich durch die Bildung von Samen auszeichnen, die gegenüber Samen von nicht transformierten Pflanzen eine größere Menge pflanzlicher Speicherstoffe wie Kohlenhydrate, Fette oder Proteine aufweisen, ohne daß dabei endogene oder exo-

gene Proteine überexprimiert werden und der Phänotyp der Pflanze sowie deren Entwicklung beeinträchtigt werden.

Das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird durch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze mit einer deregulierten und die Samenentwicklung fördernden Invertaseaktivität bereitgestellt, wobei das Verfahren vorsieht, aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen aus einer Pflanze eine Nukleotidsequenz eines Invertaseinhibitors zu gewinnen oder davon abzuleiten, eine Pflanzenzelle einer Pflanze derselben Art oder Sorte mit einem DNA-Konstrukt, enthaltend die funktionell mit mindestens einer regulatorischen Einheit verbundene Nukleotidsequenz eines Invertaseinhibitors zu transformieren, zu kultivieren und zu einer Pflanze zu regenerieren, deren Samen im Vergleich zu nicht mit einem solchen DNA-Konstrukt transformierten Pflanzen eine größere Menge an Speicherstoffen wie Kohlenhydrat, Fett oder Protein bildet.

Die Erfindung sieht insbesondere vor, transgene Pflanzen mit einer veränderten Expression eines, vorzugsweise apoplastischen, Invertaseinhibitors herzustellen, wobei sich die Pflanzen dadurch auszeichnen, das die Expression von Invertaseinhibitorproteinen während der Samenentwicklung reduziert oder ganz eliminiert ist. Das Verfahren läßt sich vorteilhafter Weise auf die unterschiedlichsten dicotylen oder monocotylen Nutzpflanzen anwenden z.B. Raps, Sonnenblumen, Erdnuß, Ölpalme, Sojabohne, Ca-



*lendula officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnanthes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis*, *Simmondsia chinensis* als Pflanzen mit Fett speichernden Samen; Mais, Reis, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen als Pflanzen mit Stärke speichernden Samen; und beispielsweise Sojabohne oder Erbse als Pflanzen mit Protein speichernden Samen.

Die Erfindung sieht also vor, eine Pflanzenzelle mit einer unter Kontrolle mindestens einer regulatorischen Einheit stehenden Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zu transformieren, wobei die Nucleotidsequenz des Invertaseinhibitorgens zur Elimination oder Reduzierung der Aktivität eines zelleigenen, endogenen Invertaseinhibitors befähigt ist. In bevorzugter Ausführungsform kann die Elimination der Aktivität eines endogenen Invertaseinhibitors in der Zelle dadurch erreicht werden, daß die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors in einem antisense-DNA-Konstrukt eingesetzt wird, d.h. ein Konstrukt, in dem eine Nucleotidsequenz des Invertaseinhibitorgens in antisense-Orientierung zu einem Promotor vorhanden ist. Durch die Expression, d.h. im vorliegenden Kontext die Transcription des antisense-Konstrukts wird die Aktivität des zelleigenen Invertaseinhibitorgens gehemmt oder reduziert, so daß die so deregulierte Invertase zu einer erhöhten Speicherstoffakkumulation im Samen führt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem antisense-Konstrukt ein DNA-Konstrukt verstanden, welches eine in antisense-Orientierung zu einem Promotor funktionell verbundene Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors aufweist, wobei diese Nucleotidsequenz entweder die full-length-cDNA des Invertaseinhibitors, eine davon abgeleitete Sequenz oder ein Fragment, allelische Variante oder Derivat davon ist.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer von einer cDNA abgeleiteten Sequenz eine mit dieser cDNA-Sequenz hybridisierende künstliche oder natürliche Nucleotidsequenz verstanden, also eine Nucleotidsequenz, die unter den in Sambrook et al. (Molecular Cloning, a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschriebenen Bedingungen mit der cDNA-Sequenz des Invertaseinhibitors hybridisiert, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen. Erfindungsgemäß weisen hybridisierende Sequenzen eine Sequenzidentität von 60, 70, 80, 90, 95 oder 97% besonders bevorzugt 99%, zu der cDNA-Sequenz eines Invertaseinhibitors auf. Sofern erfindungsgemäß Fragmente einer cDNA-Sequenz eines Invertaseinhibitors verwendet werden, weisen die Fragmente zumindest eine Länge und Sequenzähnlichkeit auf, die ausreicht, durch Hybridisierung zu Wildtyp-Transcript die Translation einer endogen gebildeten Invertaseinhibitor mRNA zu inhibieren, beispielsweise eine Länge von wenigen hundert Basenpaaren. Selbstverständlich kann auch vorgesehen sein, daß die antisense-Konstrukte Nucleotidsequenzen eines Invertaseinhibitors aufweisen oder aus diesen

bestehen, die transkribiert, aber nicht translatiert sind, d.h. nicht translatierte Regionen, sogenannte UTR's.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind unter DNA-Konstrukten, die die Elimination oder Reduktion der Aktivität eines endogenen Invertaseinhibitors bewirken können, auch DNA-Konstrukte zu verstehen, die eine wie vorstehend definierte Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors oder eine davon abgeleitete Sequenz aufweisen, die funktionell in sense-Orientierung mit mindestens einer regulatorischen Einheit, z.B. einem Promotor, verbunden sind. Mit derartigen Konstrukten kann durch Cosuppression die Bildung endogener Invertaseinhibitoren verhindert werden, z.B. dadurch, daß eine Vielzahl von sense-Kopien der Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors in dem Genom der transformierten Zelle vorhanden sind und die Expression endogener Invertaseinhibitoren eliminieren.

Die erfindungsgemäßen Konstrukte sind vorzugsweise in einem Vektor angeordnet, z.B. einem Plasmid, Virus, Cosmid, Bakteriophagen oder einem sonstigen in der Gentechnik üblichen Vektor.

Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die einzusetzende Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors nicht nur funktionell mit einem 5'-wärts gelegenen Promotor zu verbinden, sondern vorteilhafter auch 3'-wärts der Nucleotidsequenz ein Transcriptionsterminationssignal, z.B. aus dem NOS-Gen von Agrobakterium tumefaciens, einzusetzen. Selbstverständlich ist es auch möglich, in dem Vektor weite-

re funktionelle Einheiten vorzusehen, wie T-DNA border-Sequenzen oder die Vektoren stabilisierende Elemente.

Die Erfindung stellt in bevorzugterweise also Pflanzen bereit, die in ihren Samen eine im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen, wobei eine im Vergleich erhöhte Speicherstoffmenge bedeutet, daß die durchschnittliche Menge des untersuchten Speicherstoffs in Samen einer Gesamtheit von transformierten Pflanzen um vorzugsweise 5, bevorzugt 10, 20, 30 40, 50 besonders bevorzugt 90, 100, 200 oder 300% höher ist als die durchschnittliche Menge des in Frage stehenden Speicherstoffes im Samen von einer Gesamtheit nicht transformierter Pflanzen.

Die Erfindung betrifft daher die überraschende Lehre, daß mittels einer Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens, insbesondere einer cDNA eines Invertaseinhibitorgens, Pflanzen hergestellt werden können, die in-vivo eine erhöhte Speicherstoffakkumulation im Samen aufweisen, ohne daß die Entwicklung der Pflanze in anderer Hinsicht verändert oder beeinträchtigt wird. Die Erfindung beruht dabei unter anderem auf der überraschenden Tatsache, daß die endogenen Invertasen bei der Samenentwicklung einer endogenen Regulation durch Invertaseinhibitoren unterliegen.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung einer funktionell mit mindestens einer regulatorischen Einheit verbundenen Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zur Transformation und Her-

stellung von Pflanzen, die eine modifizierte Samenentwicklung aufweisen, insbesondere Samen bilden, die eine erhöhte Speicherstoffmenge gegenüber Samen nicht transformierter Pflanzen aufweisen.

Die Erfindung betrifft insbesondere die vorgenannte Verwendung einer Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors, wobei diese aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder aus Blüten mit jungen Samenanlagen der Pflanzenart oder gegebenenfalls -sorte gewonnen oder davon abgeleitet wurde, die erfindungsgemäß mit dem mittels dieser Nucleotidsequenz hergestellten DNA-Konstrukt der vorliegenden Erfindung zu transformieren ist. Die für die Transformation eingesetzte Nucleotidsequenz ist also die Nucleotidsequenz oder ist davon abgeleitet, die in der Zellsuspensionskultur oder in den Blüten mit jungen Samenanlagen vorherrschende Isoform des Invertaseinhibitors codiert.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind Blüten mit jungen Samenanlagen Blüten mit unreifen Samenanlagen, das heißt nach Bestäubung aber vor Beginn der Dormanz.

Die Lösung des technischen Problems ist erfindungsgemäß auch eine transgene Pflanzenzelle, bei der im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzenzellen aufgrund verminderter Expression von Invertaseinhibitoren eine erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase vorliegt, wobei diese verminderte Expression durch Einführung einer der gleichen Pflanzenarten entsprechenden (homologen) und unter Regula-

tion eines Promotors stehenden Invertaseinhibitor-cDNA in antisense-Orientierung ausgelöst wird. Erfindungsgemäß wird auch ein Verfahren zur Gewinnung von Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in sense- oder antisense-Orientierung bereitgestellt, wobei dieses - unabhängig von der jeweiligen Spezies - folgende Schritte enthält:

- a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion einer entsprechenden Zellsuspensionskultur
- b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entstandenen Peptide
- c) Clonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank
- d) Clonierung der Invertaseinhibitor-cDNA in sense oder antisense-Orientierung in einen Vektor, z.B. einen binären Vektor
- e) Transformation der Pflanzenspezies mit dem sense- oder antisense-Genkonstrukt.

Der Assimilattransfer zwischen maternalem Gewebe und Samengewebe ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung der pflanzlichen Speicherstoffe im Samen. Wird dieser Schritt durch die Erhöhung der Aktivität der in der Übergangszone exprimierten Zellwand-Invertase beschleunigt, so kommt es in Folge des verstärkten Assimilattrans-

fers (die erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase bewirkt eine Steigerung des Assimilattransfers zwischen maternalem und Samengewebe) zu einer erhöhten Akkumulation des Hauptspeicherstoffs der jeweiligen Pflanzenspezies (Stärke, Fett, Protein).

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der vorgenannten Pflanzen, wobei in einem ersten Schritt aus einer Zellsuspensionskultur oder aus Blüten mit jungen Samenanlagen eine Inhibitorproteinfraktion, insbesondere die vorherrschende Inhibitorproteinfraktion, aus einer Zellwandproteinfraktion gewonnen wird, anschließend in einem zweiten Schritt die Inhibitorproteinfraktion gereinigt ggf. gespalten und zumindest N-terminal sequenziert wird, so daß aus der so gewonnenen Aminosäuresequenz eine Nucleotidsequenz abgeleitet werden kann, im Rahmen eines dritten Schritts mittels beispielsweise Primern, partielle oder full-length cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen der gleichen, vorgenannten Pflanze bzw. Sorte cloniert wird, anschließend in einem vierten Schritt die gewonnene cDNA in sense- oder antisense-Orientierung in einen Vektor cloniert wird, um anschließend in einem fünften Schritt eine Pflanzenzelle gleicher Art oder Sorte mit dem so gewonnenen DNA-Konstrukt zu transformieren, wobei dies die Art oder Sorte ist, aus der die cDNA, und die Aminosäuresequenz für die cDNA-Isolierung gewonnen wurde.

Die Erfindung betrifft daher auch gemäß des vorliegenden Verfahrens hergestellte Pflanzen, Pflanzen-

teile wie Wurzel, Stengel, Blätter, Ernte- und Vermehrungsmaterial wie Früchte, Pollen, Samen, Samenschale, Embryo, Sämlinge, Zellkulturen, Kalli etc. Die Erfindung betrifft dabei jegliche Pflanzensorte oder Pflanzenart und weist demgemäß keinerlei Sorten- oder Artspezifität auf. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt ein im wesentlichen technisches Verfahren dar, wobei in dessen Rahmen eine gezielte Zuordnung vom Ausgangsmaterial für die zu verwendenden Mittel, wie cDNA-Sequenzen, zu zu transformierender, Pflanze d.h. Zielobjekt, gegeben wird.

Im Gegensatz zu allen bisherigen Verfahren beruht daher die hier beschriebene Erfindung auf der Regulation spezifischer, während der Samenentwicklung exprimierter Zellwand-Invertase-Isoformen. Die Invertaseinhibitor-cDNA codiert in bevorzugter Ausführungsform eine apoplastische Variante des Invertaseinhibitors. Durch Einführung einer einzigen autologen, d.h. aus dem zu transformierenden Organismus stammenden bzw. davon abgeleiteten cDNA-Sequenz pflanzlichen Ursprungs wird der für den Assimilattransfer entscheidende Schritt der Saccharose-spaltung am natürlichen Wirkungsort beeinflusst. Die Beobachtung, daß die Einführung mindestens einer Sequenz, das heißt einer Invertaseinhibitor-cDNA, in sense- oder antisense-Orientierung unter der Steuerung z.B. des konstitutiven CaMV35S-Promotors, des Ubiquitin-Promotors oder Zein-Promotors aus Mais oder eines Promotors ähnlich hoher oder größerer Aktivität, z.B. auch eines gewebespezifischen Promotors, die gesamte vegetative Pflanzenentwicklung nicht beeinflusst, sondern nur während der Samenentwicklung zu einer spezifischen Deregulierung



führt, zeigt die extrem hohe Spezifität des transgenen Eingriffs. Die Vorteile dieser direkten Deregulierung sind offensichtlich: 1) es genügt ein einziges Genkonstrukt, um eine signifikante Veränderung der Reservestoffakkumulation zu erreichen, 2) es werden keine artfremden Genprodukte gebildet, 3) der Eingriff im Metabolismus ist hochgradig spezifisch, 4) für Tabak wird exemplarisch gezeigt, daß die veränderte Expression eines apoplastischen Invertaseinhibitors zu drastischen Änderungen der Speicherölbildung führt.

Die Beeinflussung, insbesondere Erhöhung der Akkumulation der Samenspeicherstoffe durch eine gezielte Veränderung der Expression des Invertaseinhibitors, insbesondere Verminderung, beruht unter anderem auf folgenden Mechanismen:

- a) Durch die Veränderung der Aktivitätsphase der Zellwand-Invertase im maternalen Gewebe wird die Effizienz der Nährstoffentladung beeinflusst, das heißt z.B. in Inhibitor-antisense-Transformanten, erhöht.
- b) Für die Synthese von Reserveölen des Samens ist der oxidative Pentosephosphatzyklus von entscheidender Bedeutung. Die anhaltend erhöhte Bereitstellung von Glucose in z.B. Inhibitor-antisense-Transformanten fördert daher die Speicherölsynthese.
- c) Durch die Veränderung des Verhältnisses von Hexosen zu Saccharose wird die Zellteilungsphase der Samenentwicklung beein-

flußt. Durch eine Verlängerung der Aktivitätsphase der Zellwand-Invertase in z.B. Inhibitor-antisense-Transformanten wird z.B. die Zellzahl pro Samen erhöht.

Im Vergleich zur ebenso möglichen Überexpression der am Assimilattransfer beteiligten Zellwand-Invertase(n) hat der hier beschriebene indirekte Ansatz einer Ausschaltung der Invertaseinhibitoren noch weitere Vorteile. Die im Verlauf der Samenbildung exprimierten Zellwand-Invertasen werden bereits natürlicherweise stark exprimiert, das Ausmaß einer zusätzlichen Induktion durch Einsatz starker Promotoren ist daher begrenzt, wohingegen durch die erfindungsgemäße antisense-Ausschaltung des Inhibitors eine starke Erhöhung der Zellwand-Invertase(n)-Aktivität erreicht werden kann. Zwar könnte durch Expression einer heterologen, deregulierten, inhibitorinsensitiven Invertase mit Signalpeptid für die Zielsteuerung in den Zellwandraum ein ähnlicher Effekt erreicht werden, doch müssen in diesem Fall artfremde Proteine eingesetzt werden. Außerdem besteht bei einer Kombination der für diesen Ansatz notwendigen samenspezifischen Promotoren mit einer deregulierten Invertase die große Gefahr, daß eine zu hohe Expression zu unerwünschten Nebenwirkungen führt. Im Gegensatz hierzu wird beim hier beschriebenen Verfahren die maximale Aktivität der natürlicherweise vorkommenden Zellwand-Invertasen nie überschritten, es wird lediglich die Zeitspanne ihrer Aktivität während der Reservestoffakkumulation ausgedehnt. Aus diesen Gründen ist die indirekte Regulation der Zellwand-Invertasen über antisense-Expression von Inverta-

seinhhibitoren oder im Rahmen der Cosuppressionstechnologie über sense-DNA-Konstrukte in jedem Falle der Einführung einer heterologen Invertase vorzuziehen und stellt eine bedeutsame technische Verbesserung dar.

Methoden zur Gewinnung einer homogenen Inhibitorproteinfraktion aus der apoplastischen Zellwandproteinfraktion einer Zellsuspensionskultur

Von der jeweiligen Pflanzenspezies wird eine Zellsuspensionskultur angelegt. Die Verfahren zur Gewinnung einer Zellkultur folgen Standardprotokollen der pflanzlichen Gewebekultur. In der Regel werden die Zellen unter sterilen Bedingungen in einem komplexen Nährmedium unter Zusatz von Saccharose (Kohlenstoffquelle) als Schüttelkultur angezogen. Unter diesen Anzuchtbedingungen exprimieren pflanzliche Zellen eine Zellwand-Invertase, die durch einen ebenfalls exprimierten Invertaseinhibitor reguliert wird.

Die Anreicherung und Reinigung des Invertaseinhibitors basiert auf dessen Bindung an die Zellwandinvertase. Zunächst wird eine Zellwandproteinfraktion durch Inkubation in 1 M NaCl, 1 mM PMSF bei 4°C unter Schütteln extrahiert. Hierbei werden in der Regel keine cytosolischen Proteine extrahiert. Die so gewonnene Zellwandproteinfraktion wird über Ammoniumsulfatfällung (80%) bzw. über Membranfiltration konzentriert. Durch anschließende Chromatographie an einer Concanavalin A-Säule wird eine Glycoproteinfraktion gewonnen, die die glycosylierte Zellwand-Invertase und den an diese gebundenen Inverta-

seinh inhibitor enthält. SDS-PAGE/Western blot-Analysen der so gewonnenen Zellwand-Invertase- und damit Invertaseinhibitor-angereicherten Fraktionen mit einem polyclonalen Antiserum gegen den Invertaseinhibitor aus Tabakzellen zeigen die Präsenz von Invertaseinhibitoren, in der Regel Protein von 15-25 kDa, an.

Die Figur 1 zeigt dazu den Nachweis von zum Tabak-Invertaseinhibitor homologen Invertaseinhibitoren anderer Pflanzenarten - eine Western Blot Analyse von aus Suspensionskulturen von *Chenopodium rubrum* (1) und *Daucus carota* (2) gewonnenen Zellwandprotein-Proben. Die Entwicklung wurde mit einem gegen den rekombinanten Tabak-Invertaseinhibitor gewonnenen Antiserum vorgenommen. Für beide Spezies wurden Invertaseinhibitor-Polypeptide von ca. 17 kDa detektiert.

Die weitere Reinigung der Komplexe aus Zellwand-Invertase und Invertaseinhibitor erfolgt über Ionenaustauscherchromatographie an einem Kationenaustauscher, z.B. Sulfopropylsephadex. Nach sequentieller Chromatographie, zunächst über einen pH-Gradienten (pH 8-12), danach über einen NaCl-Gradienten, wird eine stark angereicherte Präparation der Zellwand-Invertase gewonnen, wobei der Invertaseinhibitor im stabilen Komplex mit letzterer vorliegt. Die Peak-Fractionen der letzten Ionenaustauscherreinigung werden über SDS-PAGE/Western blot-Analyse auf Zellwand-Invertase hin detektiert, z.B. mit einem Antiserum gegen die Karotten-Zellwand-Invertasen. Außerdem werden die Invertase-Aktivitäten aller Fraktionen im gekoppelten enzyma-

tischen Test mit Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ermittelt. Die Fraktionen mit starkem Zellwand-Invertase-Immunosignal aber geringer Invertaseaktivität enthalten das in der Regel hochreine Inhibitorprotein.

#### Methoden zur Gewinnung von Peptidsequenzen der gereinigten Invertaseinhibitoren

Das Inhibitorprotein liegt nach dem oben beschriebenen Reinigungsprotokoll ausreichend rein vor, um nach Elektroblob auf eine PMDF-Membran direkt N-terminal ansequenziert zu werden. Nach Gewinnung von 100-500 µg Inhibitorprotein kann dieses ggf. erneut über SDS-PAGE gereinigt und anschließend direkt im Gel tryptisch verdaut werden. Die Trennung der entstehenden Peptide über reverse phase-HPLC und deren anschließende Sequenzierung über Edmann-Abbau entspricht Standardverfahren. Die Kombination von N-terminaler Ansequenzierung und der Sequenzierung der beim tryptischen Verdau erhaltenen Peptide führt zu ausreichender Sequenzinformation für eine auf dem RT-PCR-Verfahren basierende Clonierung.

#### Verfahren zur Clonierung von zunächst partiellen und in der Folge Vollängen-cDNAs für das jeweilige Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank

Ausgehend von den erhaltenen Peptidsequenzinformationen werden gemäß des genetischen Codes Primersequenzen abgeleitet. Für das optimale Primerdesign werden Standardalgorithmen benutzt. In einer anderen Ausführung werden Primer an Hand hochkonservierter Sequenzbereiche der bereits bekannten In-

vertaseinhibitorsequenzen aus *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Arabidopsis thaliana* und *Citrus inshui* entworfen.

Zunächst wird eine 1.Strang cDNA-Synthese nach Standardverfahren durchgeführt. Hierfür wird Gesamt-RNA aus einer Zellsuspensionskultur, bzw. in einer anderen Ausführung aus Blüten mit jungen Samenanlagen nach Standardverfahren extrahiert. Über RT-PCR wird dann zunächst eine partielle Invertaseinhibitor-cDNA amplifiziert. Das Amplifikat wird in einer Ausführung in den Blueskript-Vektor cloniert. Nach Sequenzierung und Bestätigung einer zu den bereits bekannten Invertaseinhibitoren homologen Sequenz wird diese partielle cDNA als Sonde für die Gewinnung von Vollängenclonen eingesetzt. Hierfür wird nach Standardverfahren entweder eine cDNA-Bank aus einer Zellsuspensionskultur, oder in einer anderen Ausführung, eine cDNA-Bank aus Blüten mit jungen Samenanlagen angelegt.

Clonierung der Invertaseinhibitor cDNA in sense- bzw. antisense-Orientierung in einen Vektor, z.B. einen binären Vektor

Die für jede Pflanzenart clonierte Invertaseinhibitor-cDNA wird in einer Ausführungsform in den binären Vektor BinAR (Bin19 Derivat) (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) cloniert. Sowohl für antisense- wie auch für sense-Konstrukte wird in einer Ausführungsform der CaMV35S-Promotor verwendet, doch können gegebenenfalls auch andere, z.B. gewebespezifische Promotoren verwendet werden.

Figur 2 zeigt den binären Vektor (BinAR) zur Agrobakterium tumefaciens-vermittelten Transformation. Die codierenden Regionen der Invertaseinhibitor-cDNAs werden in sense- oder antisense-Orientierung in die 'multiple cloning site' cloniert.

Transformation der jeweiligen Pflanzenspezies mit den sense- bzw. antisense-Genkonstrukten

Für die meisten dicotylen Nutzpflanzen werden Invertaseinhibitor-sense/antisense-Transformanten unter Einsatz der Agrobakterium tumefaciens-vermittelten Transformation (Standardverfahren) gewonnen. Es wird demgemäß ein Agrobakterium eingesetzt, da es rekombinierte DNA-Moleküle enthält, die Invertaseinhibitor-cDNA in antisense oder sense-Orientierung aufweisen, d.h. in denen die Invertaseinhibitor cDNA 3'-wärts von einem Promotor und funktionell mit diesem verbunden vorliegt. Hierbei werden in einer für viele Pflanzenarten einsetzbaren Ausführungsform Blattstücke transformiert, wobei aus den rekombinanten Zellen auf Antibiotikumhaltigen Medium Primärtransformanten regeneriert werden. Die tatsächlich gewählte Transformationstechnik ist abhängig von der Pflanzenart. Durch Regeneration einer transformierten Pflanzenzelle wird eine transgene Pflanze erhalten.

Der Einfluß der veränderten Expression eines apoplastischen Invertaseinhibitors in *Nicotiana tabacum* wird im folgenden beschrieben:

Tabak (*Nicotiana tabacum*) wurde mit der cDNA des apoplastischen Tabak-Invertaseinhibitors (Clon Nt-

inh1; Greiner et al., a.a.O. 1998) in sense- und antisense-Orientierung transformiert (Agrobacterium tumefaciens-vermittelte Transformation, BinAR-Vektor, CaMV35S-Promotor; Blattscheiben-Transformation gemäß Standardverfahren). Die verwendete cDNA wurde aus einer Zellsuspensionskultur von Tabak gewonnen. Primärtransformanten wurden zunächst über Gewebekultur zu Pflanzen regeneriert und anschließend im Gewächshaus zur Blüte gebracht. Die Samen der Primärtransformanten wurden auf Kanamycin-haltigem Medium ausgesät. Nach steriler Voran- zucht wurden die Pflanzen der F1-Generation im Ge- wächshaus zur Blüte gebracht. Nach Bestäubung wur- den in regelmäßigen Zeitabständen die Zellwand- Invertase-Aktivitäten in den Ovarien bestimmt.

Die Figur 3 zeigt Zellwand-Invertase-Aktivitäten im Ovar von Tabak-Wildtyp (SNN), einer repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformante (as16) und einer repräsentativen Inhibitor-sense-Transformante (s9) im Verlauf der frühen Samenentwicklung (0-14 Tage nach Befruchtung). Die Aktivitäten sind in mmol Glucose/g Frischgewicht/min angegeben.

Die Menge an Invertaseinhibitor-Protein wurde über Western Blot-Analyse ermittelt.

Figur 4 zeigt diesbezüglich den Nachweis der selek- tiven Reduktion (antisense-Transformante) bzw. Zu- nahme (sense-Transformante) des Invertaseinhibitor- Polypeptids in Stamina und Ovar, nachgewiesen mit einem gegen den rekombinanten Tabak- Invertaseinhibitor gerichteten Antiserum. (Sense- Transformante (s9): 1, Ovar; 2, Stamina. Antisense-



Transformante: 3, Ovar; 4, Stamina. Wildtyp (SNN): 5, Ovar; 6, Stamina). Es wurden über Concanavalin A-Chromatographie gereinigte Proben aufgetragen, in denen nur an Zellwand-Invertase gebundener Inhibitor enthalten ist.

Nach Reifung der Samen wurden deren Trockengewichte bestimmt, sowie die Menge an Speicheröl und Gesamtprotein.

Die Messung der Zellwand-Invertase-Aktivitäten während der frühen Samenentwicklung (Fig.3) zeigt zunächst für den Wildtyp eine ca. 6-fache Steigerung zwischen dem 6. und 12. Tag nach Bestäubung. Dieser Zeitraum entspricht der späten Zellteilungsphase und dem Beginn der Speicherphase. Die Western Blot-Analyse zeigt, daß im Ovar die Menge an Invertaseinhibitor-Polypeptid in antisense-Transformanten stark vermindert, in sense-Transformanten hingegen stark erhöht ist (Fig.4). Im Unterschied hierzu wirkt sich die veränderte Inhibitorexpression in Stamina nur geringfügig aus, vermutlich weil in diesem Gewebe mehrere Inhibitor-Isoformen exprimiert werden.

Die veränderte Aktivität der Zellwand-Invertase während der Samenentwicklung wirkt sich aus auf das Trockengewicht/Samen (Tab.1), den Gehalt an Speicheröl/Samen (Tab.2) und den Gesamtproteingehalt/Samen (Tab.3), nicht jedoch auf die Gesamtzahl an Samen pro Blüte und auch nicht auf die Samengröße.

Tab.1

Trockengewichte pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-sense-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	$\mu\text{g}$ Trockengewicht/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	64 $\pm$ 2	100
s9	42 $\pm$ 2	66
s10	52 $\pm$ 2	81
as16	71 $\pm$ 1	110
as43	86 $\pm$ 4	134

Tab.2

Samenöl-Gehalte pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-sense-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	$\mu\text{g}$ Gesamtöl/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	23	100
s9	10	43
s10	16	69
as16	28	122
as43	39	170

Tab.3

Gesamtprotein pro Samen in Tabak-Wildtyp (SNN), in zwei repräsentativen Inhibitor-sense-Transformanten (s9, s10) und in zwei repräsentativen Inhibitor-antisense-Transformanten (as16, as43).

Tabak-Linie	µg Gesamtprotein/Samen	Prozent vom Wildtyp (SNN)
WT (SNN)	7.4	100
s9	5.5	74
s10	5.7	77
as16	7.8	105
as43	9.9	134

Die starke Erhöhung des Speicherölgehaltes in zwei unabhängigen antisense-Transformanten (+22% bzw. +70%) korreliert mit Zunahmen an Gesamtprotein und Samengewicht, wobei die Zunahme für Speicheröl am stärksten ausgeprägt ist. Bemerkenswerterweise korreliert die Zunahme der Zellwand-Invertase-Aktivität im Ovar während der Samenentwicklung mit der Phase der maximalen Akkumulation von Speicheröl.

Die gesamte vegetative Entwicklungsphase der Inhibitor-antisense- und Inhibitor-sense-Transformanten verläuft ohne sichtbaren Phänotyp, mit Ausnahme des Keimungsvorganges. Hier zeigt sich zwischen der Keimung von Tabak-Wildtyp-Samen und Invertaseinhibitor-antisense-Samen kein Unterschied, wohingegen es bei Samen von Invertaseinhibitor-sense-Trans-

formanten zu einer signifikanten Verzögerung der Keimung kommt.

Figur 5 zeigt das Keimungsverhalten von Samen des Tabak-Wildtyps (SNN), von Invertaseinhibitor-antisense-Transformanten (INHAs) und von Invertaseinhibitor-sense-Transformanten. Pro Linie wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 40 Samen auf LS-Medium (0.5% Saccharose, pH 5.6) ausgesät. Das Hervortreten der Radicula diente als Kriterium für die Keimung.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist die Einführung eines Invertaseinhibitor-antisense-Konstruktes in Raps (*Brassica napus*). Raps enthält auf Samenbasis eine dem Tabak vergleichbare Menge an Speicheröl. Das Ergebnis einer Invertaseinhibitor-antisense-Transformation ist eine Erhöhung des Speicherölgehaltes um mindestens 20% , ggf. aber um bis zu 70%.

Eine weitere Anwendung mit dem gleichen Ziel, nämlich der Erhöhung des Speicheröl-Gehaltes, ist die Transformation der Sonnenblume, oder auch die Transformation der Sojabohne, mit einem Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukt (Bereitstellung transgener ölspeichernder Pflanzen dieser Spezies).

In einer weiteren Ausführungsform wird durch die Einbringung von Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukten in Mais, Reis, Weizen, Hafer, Gerste und Roggen die Menge an Samen-Speicherstärke erhöht. Es können also transgene Pflanzenzellen oder Pflanzen, die Stärke speichern, bereitgestellt wer-

den. Für proteinreiche Samen, z.B. Sojabohne und Erbse, wird in einer weiteren Ausführungsform durch Einführung von Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukten die Gesamtmenge an Speicherprotein erhöht.

In einer weiteren Ausführungsform wird durch die Einführung von Invertaseinhibitor-antisense-Konstrukten bzw. durch die daraus resultierende verbesserte Speicherstoffakkumulation die Keimfähigkeit von Samen einer Nutzpflanze erhöht.

Die Bereitstellung transgener Pflanzenzellen oder Pflanzen betrifft vorzugsweise Nutzpflanzen.

Ansprüche:

1. Transgene Pflanzenzelle bei der im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzenzellen aufgrund verminderter Expression von Invertaseinhibitoren eine erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase vorliegt, wobei diese verminderte Expression durch Einführung einer der gleichen Pflanzenart entsprechenden (homologen) und unter Regulation eines Promotors stehenden Invertaseinhibitor-cDNA in antisense-Orientierung ausgelöst wird.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die erhöhte Aktivität der Zellwand-Invertase eine Steigerung des Assimilattransfers zwischen maternalem und Samengewebe bewirkt.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Invertaseinhibitor-cDNA eine apoplastische Variante des Invertaseinhibitors codiert.
4. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Promotor ein CaMV35S-Promoter oder ein gewebespezifischer Promotor vergleichbarer oder höherer Aktivität ist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die eine Zelle einer Nutzpflanze ist.

6. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5, die eine Zelle einer ölspeichernden Pflanze ist.
7. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5 oder 6, die eine Zelle von Raps, Sojabohne, Sonnenblume, Ölpalme, *Calendula officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnanthes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis* oder *Simmondsia chinensis* ist.
8. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5, die eine Zelle einer stärkespeichernden Pflanze ist.
9. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 5 oder 8, die eine Zelle von Reis, Mais, Roggen, Weizen, Hafer oder Gerste ist.
10. Transgene Pflanze, die durch Regeneration einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9 gewonnen werden kann.
11. Transgene Pflanze nach Anspruch 10, die gegenüber der entsprechenden nicht transformierten Pflanze während der Samenentwicklung mehr Speicheröl, Speicherstärke oder Speicherprotein bildet.

12. Verfahren zur Gewinnung von in einem Vektor enthaltenden Invertaseinhibitor-cDNA-Sequenzen in sense-oder antisense-Orientierung, umfassend folgende Schritte:

- a) Gewinnung einer Inhibitorproteinfraktion aus der Zellwandprotein-Fraktion einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen,
- b) Gewinnung von entsprechenden Peptidsequenzen nach Spaltung und Reinigung der entstandenen Peptide,
- c) Clonierung von zunächst partieller und in der Folge Vollängen-cDNA für das Invertaseinhibitorprotein aus einer cDNA-Bank, insbesondere aus einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen und
- d) Clonierung der Invertaseinhibitor-cDNA in sense- oder antisense-Orientierung in einen Vektor, insbesondere einen binären Vektor.

13. Verfahren zur Herstellung einer transgenen, eine deregulierte und die Samenentwicklung fördernde Invertaseaktivität aufweisenden Pflanze, wobei eine Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder von Blüten mit jungen Samenanlagen einer Pflanze gewonnen wird, eine Pflanzenzelle einer Pflanze der gleichen Art



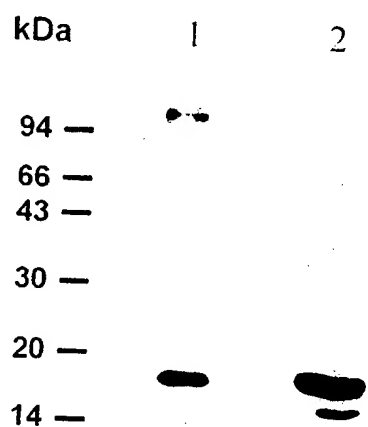
oder Sorte aus der die Nucleotidsequenz stammt oder abgeleitet ist mit einem DNA-Konstrukt, enthaltend die mit mindestens einer regulatorischen Einheit funktionell verbundene Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens, transformiert, kultiviert und eine Pflanze regeneriert wird, deren Samen eine gegenüber nicht transformierten Wildtyppflanzen erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die regulatorische Einheit ein Promotor ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Promotor ein konstitutiver oder induzierbarer Promotor ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Promotor der 35SCaMV Promotor oder der Ubiquitin- oder Zein-Promotor aus Mais ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens eine cDNA, eine damit hybridisierende Nucleotidsequenz oder ein Fragment, einer der beiden ist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei der Invertaseinhibitor ein apoplastischer Invertaseinhibitor ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei die Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitors sense- oder antisense-Orientierung zu dem Promotor aufweist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei das DNA-Konstrukt weitere regulatorische Einheiten, insbesondere ein Transcriptionsterminationssignal, aufweist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, wobei das Transcriptionsterminationssignal aus dem NOS-Gen von *Agrobacterium tumefaciens* stammt.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 21, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle einer dicotylen oder monocotylen Pflanze ist.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Pflanzenzelle eine Zelle von Raps, Sonnenblumen, Erdnuß, Sojabohne, Ölpalme, Reis, Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Roggen, Erbse, *Calendula officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* ssp., *Dimorphotheca pluvialis*, *Euphorbia lagascae*, *Euphorbia lathyris*, *Lesquerella grandiflora*, *Limnanthes alba*, *Linum usitatissimum*, *Lunaria annua*, *Lunaria biennis*, *Oenothera* ssp., *Ricinus communis* oder *Simmondsia chinensis* ist.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 23, wobei das DNA-Konstrukt in einem Vektor, insbesondere einem Plasmid oder Virus, vorliegt.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei die Transformation der Pflanzenzelle mittels *Agrobacterium tumefaciens*, biolistischer Verfahren, mittels elektrisch oder chemisch induzierter DNA Aufnahme, Elektroporation, Makroinjektion, Mikroinjektion oder PEG-vermittelter Transformation durchgeführt wird.
26. Transgene Pflanze, herstellbar nach einem der Verfahren der Ansprüche 13 bis 25 sowie ein Teil davon.
27. Vermehrungs- und Erntematerial einer Pflanze nach Anspruch 26.
28. Vermehrungs- und Erntematerial nach Anspruch 27, das Frucht, Samen, Samenschale, Embryo, Sämling, Kallus, Zellkultur, Stengel, Blatt oder Wurzel ist.
29. Verwendung einer funktionell mit mindestens einer regulatorischen Einheit verbundenen Nucleotidsequenz eines Invertaseinhibitorgens zur Transformation und Herstellung von transgenen Pflanzen, die als Folge der Transformation eine modifizierte Samenentwicklung aufweisen.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die modifizierte Samenentwicklung eine Samenentwicklung ist, gemäß der die Samen der transgenen Pflanze eine gegenüber Samen einer nicht transformierten Wildtyppflanze eine erhöhte Speicherstoffmenge aufweisen.

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 oder 30 wobei die Nucleotidsequenz aus einer cDNA-Bank einer Zellsuspensionskultur oder aus Blüten mit jungen Samenanlagen der zu transformierenden Pflanzenart oder -sorte stammt oder davon abgeleitet ist.
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 31, wobei die Nucleotidsequenz in antisense-Orientierung zu der mindestens einen regulatorischen Einheit, insbesondere dem Promotor, vorliegt.





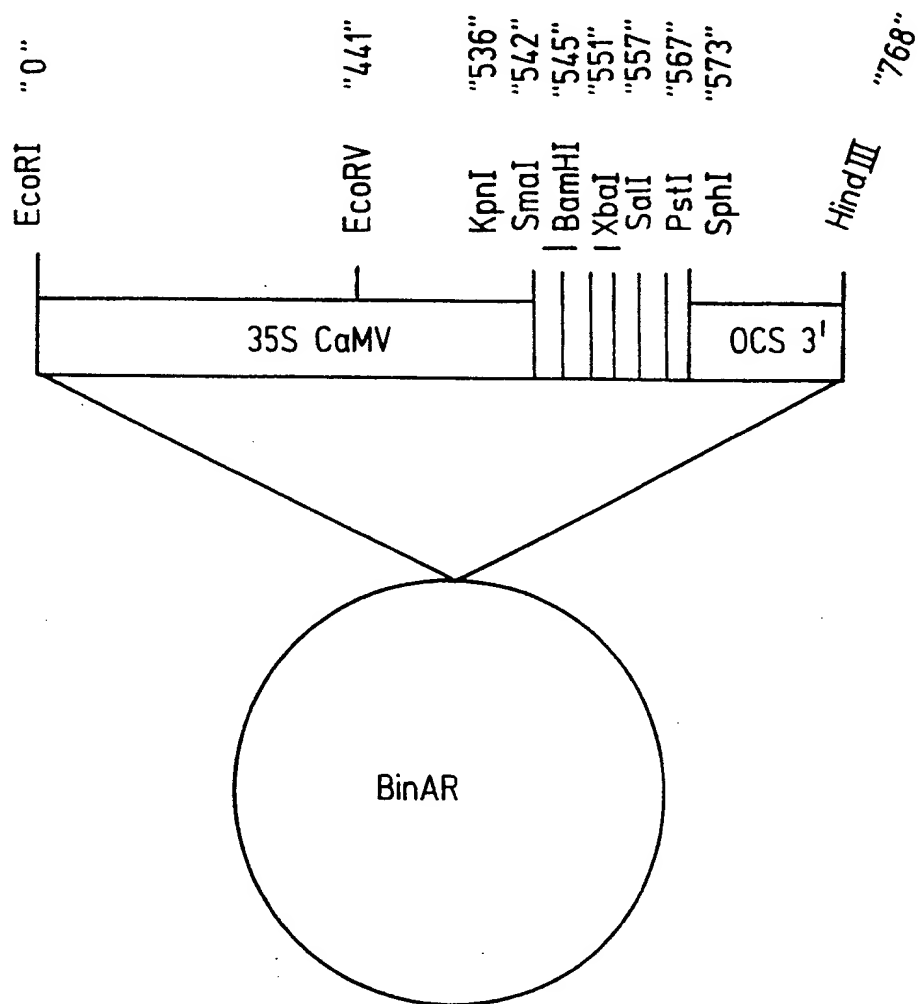


Fig.2





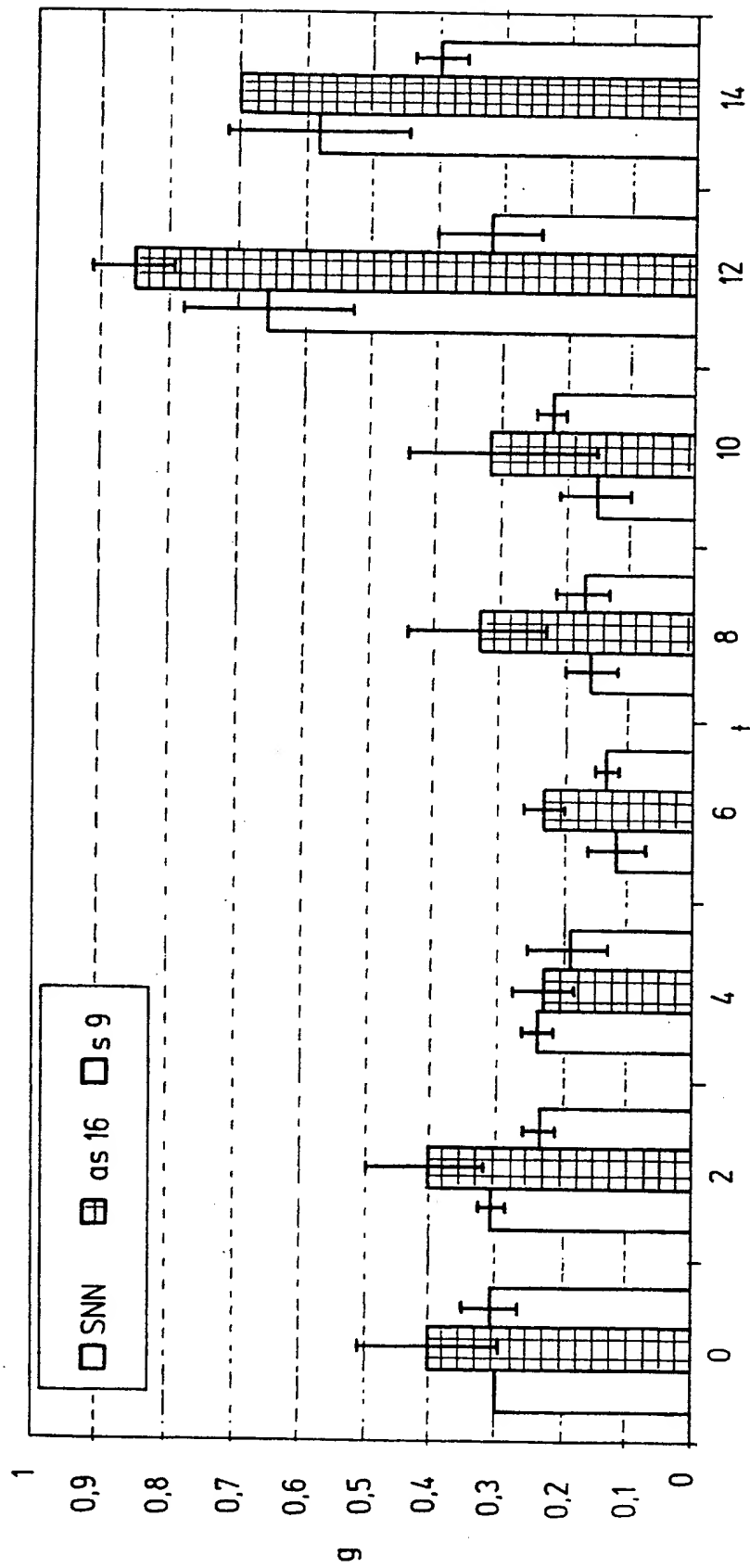
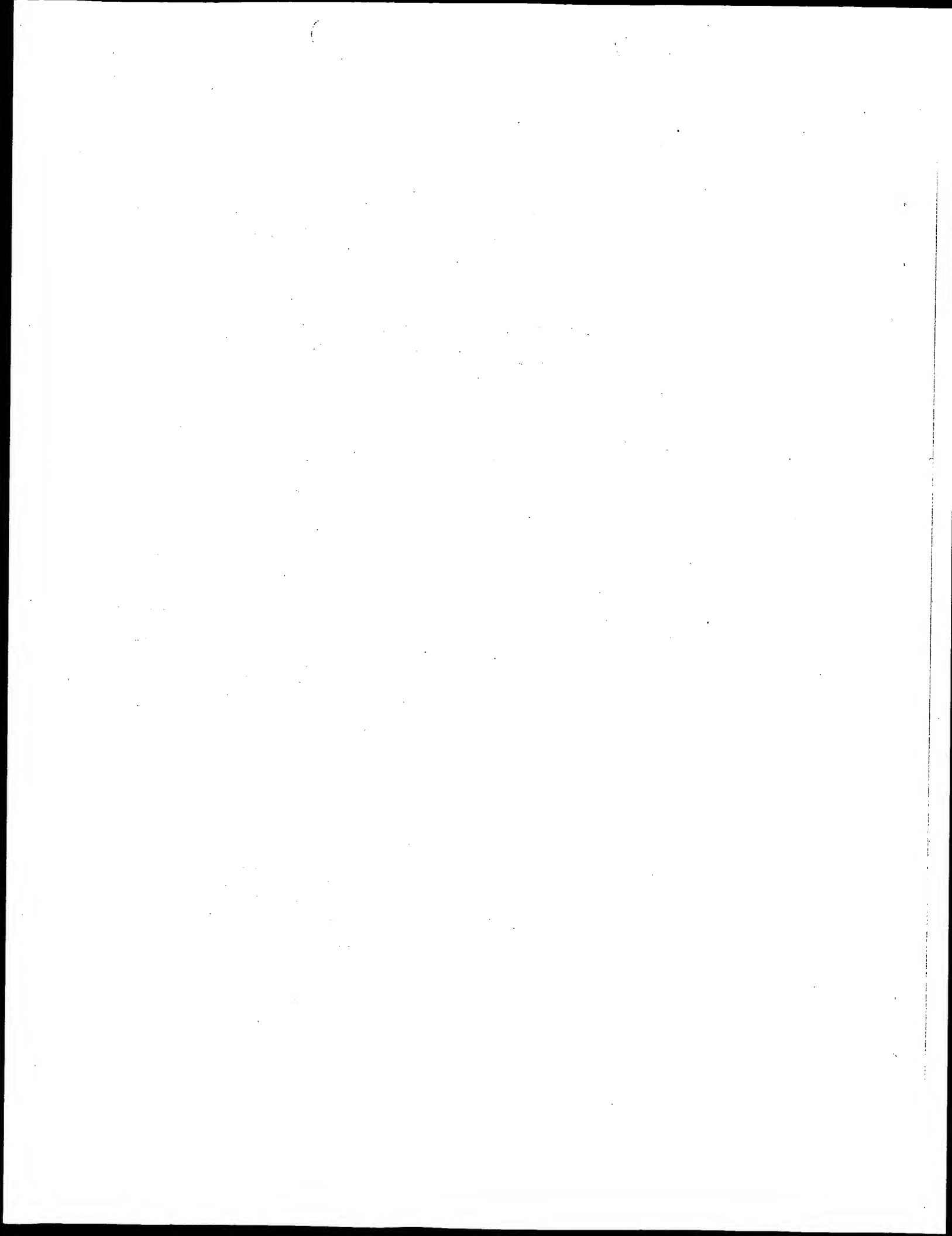


Fig.3



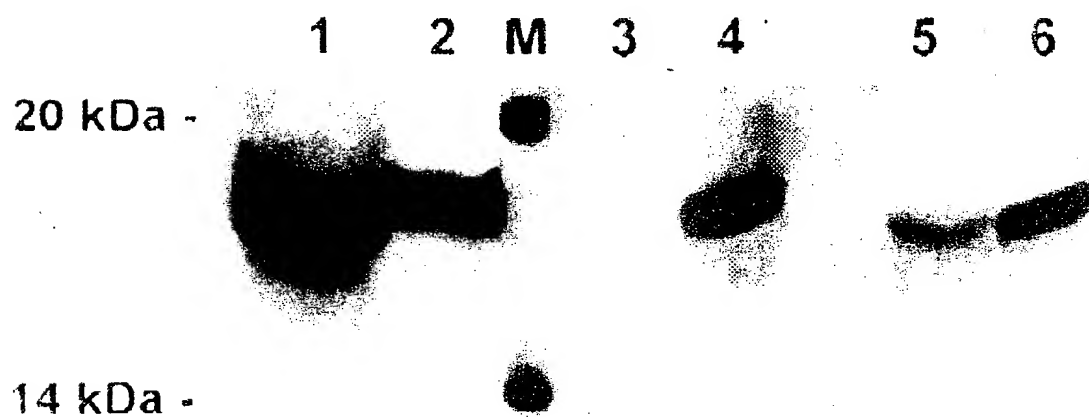


Fig. 4



5 / 5

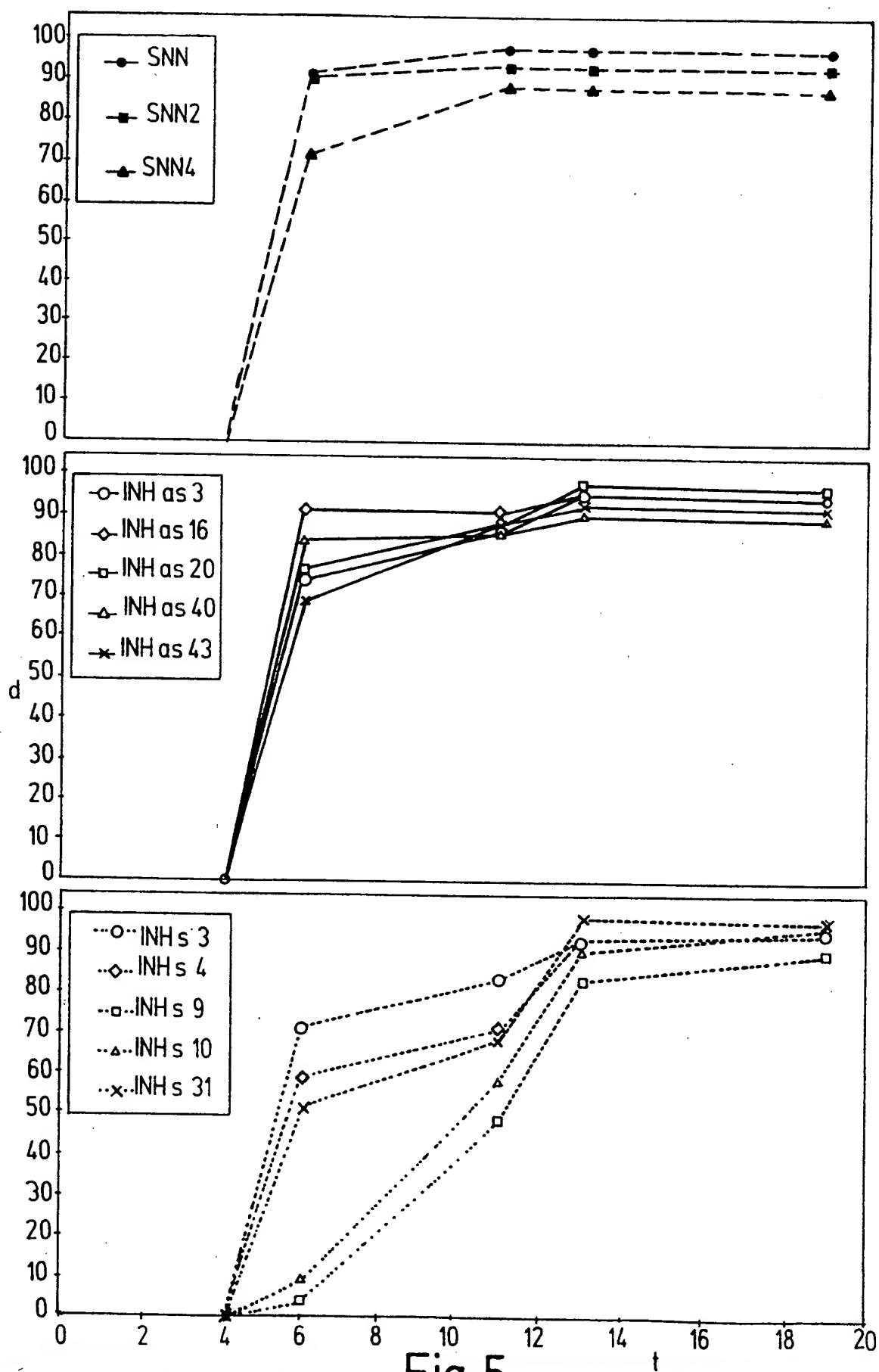


Fig. 5

( )

( )

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No  
PCT/EP 99/05890

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GREINER, S., ET AL. : "cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 116, February 1998 (1998-02), pages 733-742, XP002125613 cited in the application the whole document	1-5, 11-22, 24-32
A	KRAUSGRILL, S., ET AL. : "in transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase" THE PLANT JOURNAL, vol. 13, no. 2, January 1998 (1998-01), pages 275-280, XP002125614 the whole document	1-32
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 December 1999

Date of mailing of the international search report

11/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Holtorf, S

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KRAUSGRILL S ET AL: "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, vol. 47, page 1193-1198 XP002050469 ISSN: 0022-0957 page 1194, left column; page 1197</p>	1-32
A	<p>SANDER A ET AL: "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 385, no. 3, page 171-175 XP002049864 ISSN: 0014-5793 the whole document</p>	1-32
A	<p>EP 0 442 592 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21 August 1991 (1991-08-21) column 15 -column 18</p>	1-32
A	<p>WO 97 07221 A (RIESMEIER JOERG ; TRETHEWEY RICHARD (DE); WILLMITZER LOTHAR (DE)) 27 February 1997 (1997-02-27) page 5</p>	1-32
A	<p>WO 98 04722 A (RAUSCH THOMAS ; GREINER STEFFEN (DE); UNIV HEIDELBERG (DE); KRAUSGR) 5 February 1998 (1998-02-05) page 12, lines 3-9</p>	1-32



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Application No

PCT/EP 99/05890

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0442592	A	21-08-1991	DE 4004800 A	14-08-1991
			AU 650639 B	30-06-1994
			AU 7089891 A	15-08-1991
			CA 2036103 A	14-08-1991
			JP 5049482 A	02-03-1993
			US 5436394 A	25-07-1995
			US 5917127 A	29-06-1999
WO 9707221	A	27-02-1997	DE 19529696 A	13-02-1997
			AU 6820496 A	12-03-1997
			CA 2229061 A	27-02-1997
			CN 1196090 A	14-10-1998
			EP 0846180 A	10-06-1998
WO 9804722	A	05-02-1998	DE 19630738 A	05-02-1998
			EP 0956357 A	17-11-1999



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C07K14/415 C12N5/10 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GREINER, S., ET AL. : "cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 116, Februar 1998 (1998-02), Seiten 733-742, XP002125613 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-5, 11-22, 24-32
A	KRAUSGRILL, S., ET AL. : "in transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase" THE PLANT JOURNAL, Bd. 13, Nr. 2, Januar 1998 (1998-01), Seiten 275-280, XP002125614 das ganze Dokument	1-32

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

17. Dezember 1999

Abschließendes Datum des Internationalen Recherchenberichts

11/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	KRAUSGRILL S ET AL: "REGULATION OF CELL WALL INVERTASE BY A PROTEINACEOUS INHIBITOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, Bd. 47, Seite 1193-1198 XP002050469 ISSN: 0022-0957 Seite 1194, linke Spalte; Seite 1197	1-32
A	SANDER A ET AL: "SUCROSE PROTECTS CELL WALL INVERTASE BUT NOT VACUOLAR INVERTASE AGAINST PROTEINACEOUS INHIBITORS" FEBS LETTERS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 385, Nr. 3, Seite 171-175 XP002049864 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument	1-32
A	EP 0 442 592 A (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 21. August 1991 (1991-08-21) Spalte 15 -Spalte 18	1-32
A	WO 97 07221 A (RIESMEIER JOERG ; TRETHEWEY RICHARD (DE); WILLMITZER LOTHAR (DE)) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Seite 5	1-32
A	WO 98 04722 A (RAUSCH THOMAS ; GREINER STEFFEN (DE); UNIV HEIDELBERG (DE); KRAUSGR) 5. Februar 1998 (1998-02-05) Seite 12, Zeile 3-9	1-32

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

..national. Aktenzeichen

PCT/EP 99/05890

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0442592 A	21-08-1991	DE 4004800 A	14-08-1991
		AU 650639 B	30-06-1994
		AU 7089891 A	15-08-1991
		CA 2036103 A	14-08-1991
		JP 5049482 A	02-03-1993
		US 5436394 A	25-07-1995
		US 5917127 A	29-06-1999
WO 9707221 A	27-02-1997	DE 19529696 A	13-02-1997
		AU 6820496 A	12-03-1997
		CA 2229061 A	27-02-1997
		CN 1196090 A	14-10-1998
		EP 0846180 A	10-06-1998
WO 9804722 A	05-02-1998	DE 19630738 A	05-02-1998
		EP 0956357 A	17-11-1999